

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2004 年 2 月 26 日 (26.02.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/016275 A1

(51) 国際特許分類: A61K 31/728, 45/08, 9/08, A61P 19/02

(21) 国際出願番号: PCT/JP2002/008328

(22) 国際出願日: 2002 年 8 月 16 日 (16.08.2002)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 電気化学工業株式会社 (DENKI KAGAKU KOGYO KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒100-8455 東京都千代田区有楽町 1 丁目 4 番 1 号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 宮田 喜明 (MIYATA, Yoshiaki) [JP/JP]; 〒194-8560 東京都町田市旭町 3 丁目 5 番 1 号 電気化学工業株式会社 中央研究所内 Tokyo (JP). 堀田 康一 (HIMEDA, Yasukazu) [JP/JP]; 〒194-8560 東京都町田市旭町 3 丁目 5 番 1 号 電気化学工業株式会社 中央研究所内 Tokyo (JP). 橋本 正道 (HASHIMOTO, Masamichi) [JP/JP]; 〒194-8560 東京都町田市旭町 3 丁目 5 番 1 号 電気化学工業株式会社 中央研究所内 Tokyo (JP). 梅田 俊彦 (UMEDA, Toshihiko) [JP/JP]; 〒194-8560 東京都町田市旭町 3 丁目 5 番

1 号 電気化学工業株式会社 中央研究所内 Tokyo (JP). 三好 照三 (MIYOSHI, Teruzou) [JP/JP]; 〒194-8560 東京都町田市旭町 3 丁目 5 番 1 号 電気化学工業株式会社 中央研究所内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 泉名 謙治, 外 (SENMYO, Kenji et al.); 〒101-0042 東京都千代田区神田東松下町 3 8 番地 鳥本鋼業ビル Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PI, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーロピア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ユーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NI, PT, SE, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[続案有]

(54) Title: SEPARATE TYPE MEDICAL MATERIAL

(54) 発明の名称: 分離型医療材料

(57) Abstract: A separate type medical material which includes a hyaluronic acid ester derivative and can reconcile storage stability of the hyaluronic acid ester derivative with avoidance of the irritation or pain caused by arthropathy remedy injections. The medical material comprises liquids (A) and (B) which are held separate from each other, wherein the liquid (A) is an aqueous solution containing a hyaluronic acid ester derivative and buffered at a pH of 4.5 to 6.5, and the liquid (B) is an aqueous solution having such a buffering ability that when the liquid (B) is mixed with the liquid (A), the resultant mixture has a pH of 6.8 to 7.8.

(57) 要約:

ヒアルロン酸のエステル誘導体の保存安定性と、関節治療剤の注射時の刺激性や疼痛の回避をできるヒアルロン酸エステル誘導体を含む分離型医療材料を提供する。

pH 4.5 ~ 6.5 に緩衝されたヒアルロン酸エステル誘導体を含む水溶液の (A) 液と、該 (A) 液と混合したときの pH を 6.8 ~ 7.8 の範囲内にする緩衝能を有する水溶液の (B) 液とが分離された状態で保持されている分離型医療材料。



添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明 細 書

分離型医療材料

技術分野

本発明は、生体適合性のヒアルロン酸のエステル誘導体を用いた関節症治療用注入剤に関するものである。

背景技術

ヒアルロン酸は、 β -D-N-アセチルグルコサミンと β -D-グルクロン酸が交互に結合した直鎖状の高分子多糖である。ヒアルロン酸は哺乳動物の結合組織に分布するほか、ニワトリのとさか、連鎖球菌の夾膜などにも存在が知られている。ニワトリのとさか、臍帯等が抽出材料として用いられているほか、連鎖球菌の培養物からも精製物が調製されている。

天然産のヒアルロン酸は、分子量について多分散性であるが、種及び臓器特異性をもたず、生体に移植または注入した場合であっても優れた生体適合性を示すことが知られている。

関節液は、生体関節において関節軟骨へ栄養を供給するとともに、他に類を見ない優れた潤滑機能とショックアブソーバー機能を有し、その優れた粘弾性機能は関節液中の主成分の一つであるヒアルロン酸に大きく支配されている。ヒアルロン酸の分子量は数百万～1千万もの高分子量であることが知られている。

一般に、変形性関節症、慢性関節リウマチ等の各種関節症患者の関節液中のヒアルロン酸濃度及び分子量の分析結果から、関節症患者の関節液は正常関節液に比較し、濃度、分子量において低下傾向が認められており、このことが関節液の潤滑作用、関節軟骨表面保護作用の低下に起因する運動機能障害や疼痛症状の発生に密接な関係があるものと考えられている。

これら関節疾患のうち変形性膝関節症に有効な手段として、ヒアルロン酸溶液を疾患関節部位へ注入する方法が採用されてきており、その膝関節治療剤の例と

しては、アルツ（生化学工業社製、平均分子量90万）、Hyalgan（Fidia社製、平均分子量<50万）や、高分子量の方が一層の効果が期待できるとの考えのもとに本発明者らが開発した、慢性関節リウマチにも適応するスペニール（アベンティスファーマ社／中外製薬社／電気化学工業社製、平均分子量190万）が挙げられる。

また、ヒアルロン酸を化学的に架橋することで高分子化し粘弾性を改良した、架橋ヒアルロン酸ゲルを含有するSynvisc（ジェンザイム社製）が開発されている。この架橋ヒアルロン酸ゲルは架橋剤ジビニルスルホンでヒアルロン酸を化学的に架橋したヒアルロン酸ゲルでハイランと呼ばれる。ハイラン及びハイランを架橋したゲルの生成法は、米国特許第4,713,448号に詳細に記載されている。ヒアルロン酸をベースとする単一及び混合ゲルは、米国特許第4,582,865号及び同第4,605,691号に記載されている。

これら関節製剤を用いた治療は、患者の関節に直接、1週間毎に3～5回の注射を行う必要があり、患者及び医者負担の面から注射回数の低減が望まれている。

自己架橋ヒアルロン酸を含む関節治療剤に関する技術もW097/49412に記載されている。ヒアルロン酸を架橋することによる粘弾性的な性質の制御と、関節内での滞留性を目的としている。自己架橋ヒアルロン酸とヒアルロン酸の水溶液を均一に混合することによって、粘弾性を制御する技術が開示されている。自己架橋ヒアルロン酸が関節腔内で加水分解することにより、天然のヒアルロン酸の容器（reservoirs）となり得ることも概念的に示されている。

関節液のpHは約7.3～7.6である。（日本生化学学会編、生化学ハンドブックI、東京化学同人、1979年、p1569）関節腔内に注射される関節治療剤のpHが、関節液のpHと大幅に異なった場合、刺激性や疼痛の原因となることが指摘されている。このため、アルツやスペニールのpHは7.4を中心とした範囲に調整されている。

医療機関での投薬調整時の負担軽減、細菌汚染や異物混入の防止等を目的とし、

関節治療剤についても、バイアル製剤からプレフィルシリンジの様なキット製剤に、販売形態が大きく変化してきた。バイアル製剤から、特に高粘度のヒアルロン酸製剤を注射筒に吸引する時間は長く、吸引した量のバラツキも大きい。キット製剤では、医療機関での投薬調整の負担を軽減するとともに、設定液量を容易に、より均一に注入することができ、医療上有益な剤形であることが示されている。

本発明者らは、ヒアルロン酸のエステル誘導体、特に自己架橋ヒアルロン酸の性質を鋭意検討する過程で該エステル誘導体が中性領域では十分な安定性を持たないことを見出した。生体に投与するような医療材料は、生理的条件である中性領域になるように製剤化されるが、このような条件で医療材料としてヒアルロン酸のエステル誘導体を適応した場合には、流通過程等での長期保存に耐えられない可能性が考えられた。

そこで、特にこのようなヒアルロン酸のエステル誘導体から成る医療材料の製剤化に当たり、ヒアルロン酸のエステル誘導体が中性pH領域で不安定となるといった問題を解決するために、該エステル誘導体を安定に提供する方法を鋭意検討してきた。その結果、該エステル誘導体がpH4.5～6.5の弱酸性領域条件下で安定性が高まることを見出した。そして、ヒアルロン酸のエステル誘導体を成分とする医療材料を提供する場合に、弱酸性のヒアルロン酸のエステル誘導体の分散水溶液とその中和剤溶液、中和剤溶液中にヒアルロン酸が溶解している場合も含めて、両者を異なったpH条件になるように、分離された状態で充填しておき、治療時に混合して注入でき、最終的には生理的な中性pH条件で投与できるような製剤を考案し、本発明を完成するに至った。

発明の開示

本発明は、以下の構成を要旨とする。

- (1) pH4.5～6.5に緩衝されたヒアルロン酸エステル誘導体を含む水溶液の(A)液と、該(A)液と混合したときのpHを6.8～7.8の範囲内に

する緩衝能を有する水溶液の（Ｂ）液とからなり、（Ａ）液と（Ｂ）液とは投与時には混合して投与されるが、投与前は分離された状態で保持されていることを特徴とする分離型医療材料。

（２）（Ａ）液のヒアルロン酸エステル誘導体が、自己架橋ヒアルロン酸であることを特徴とする（１）記載の分離型医療材料。

（３）（Ａ）液のヒアルロン酸エステル誘導体を含む水溶液のヒアルロン酸エステル誘導体の濃度が１～２０質量％の範囲であることを特徴とする（１）又は（２）に記載の分離型医療材料。

（４）（Ａ）液と混合したときのｐＨを６．８～７．８の範囲内にする緩衝能を有する水溶液の（Ｂ）液が、ヒアルロン酸を溶解した水溶液であることを特徴とする（１）、（２）又は（３）に記載の分離型医療材料。

（５）更に、医薬品又は医薬的に受容し得る潤滑剤を含有することを特徴とする（１）～（４）のいずれかに記載の分離型医療材料。

（６）ｐＨ４．５～６．５に緩衝されたヒアルロン酸エステル誘導体を含む水溶液の（Ａ）液に、医薬品又は医薬的に受容し得る潤滑剤が溶解又は分散していることを特徴とする（５）に記載の分離型医療材料。

（７）（Ａ）液のヒアルロン酸エステル誘導体中に、医薬品又は医薬的に受容し得る潤滑剤が溶解又は分散していることを特徴とする（５）又は（６）に記載の分離型医療材料。

（８）（Ａ）液と混合したときのｐＨを６．８～７．８の範囲内にする緩衝能を有する水溶液の（Ｂ）液に、医薬品又は医薬的に受容し得る潤滑剤が溶解又は分散していることを特徴とする（５）～（７）に記載の分離型医療材料。

（９）医薬的に受容し得る潤滑剤がリン脂質であることを特徴とする（５）～（８）のいずれかに記載の分離型医療材料。

（１０）シリンジに（Ａ）液と（Ｂ）液とが分離した状態で充填された関節注入型医療材料であることを特徴とする（１）～（９）のいずれかに記載の分離型医療材料。

(11) (1) ~ (10) のいずれかの分離型医療材料を構成する(A)液と(B)液とを、投与直前に混合した混合液を患者の関節に注入して投与することとを特徴とする関節疾患用医療材料の投与方法。

図面の簡単な説明

図1：本発明の分離型医療材料の一実施例の態様である、プレフィルシリンジに充填されたサンプルの概略図である。

符号の説明

- 1 : 先端部密封用部品
- 2 : ラバーストッパー
- 3 : シリンダー
- 4 : プランジャー・ロッド
- (A) : ゲル懸濁液
- (B) : ヒアルロン酸溶液

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明に用いられるヒアルロン酸は、動物組織から抽出したものでも、また発酵法で製造したものでもその起源を問うことなく使用できる。

発酵法で使用する菌株は自然界から分離されるストレプトコッカス属等のヒアルロン酸生産能を有する微生物、又は特開昭63-123392号公報に記載したストレプトコッカス・エクイFM-100(微工研菌寄第9027号)、特開平2-234689号公報に記載したストレプトコッカス・エクイFM-300(微工研菌寄第2319号)のような高収率で安定にヒアルロン酸を生産する変異株が望ましい。上記の変異株を用いて培養、精製されたものが用いられる。

本発明に用いられるヒアルロン酸の分子量は、約 1×10^5 ~ 約 1×10^7 ダルトンの範囲内のものが好ましい。また、上記範囲内の分子量をもつものであれば、

より高分子量のものから加水分解処理等をして得た低分子量のものでも同様に好ましく使用できる。

尚、本発明でいうヒアルロン酸は、そのアルカリ金属塩、例えば、ナトリウム、カリウム、リチウムの塩をも包含する概念で使用される。

ヒアルロン酸のエステル誘導体、及びその製造方法としては、一部またはすべてのカルボキシ基が、脂肪族、芳香族、アリール脂肪族 (arylalip ヒアルロン酸 lic)、環状脂肪族、複素環式系列のアルコールでエステル化されたヒアルロン酸 エステルが EP 0216453 B1 に開示される。また、一部またはすべてのカルボキシ基 が同一の多糖鎖または他の多糖鎖のアルコール基でエステル化された、自己架橋 ヒアルロン酸 エステルが EP 0341745 B1 に開示される。また、一部またはすべての カルボキシ基が脂肪族、芳香族、アリール脂肪族、環状脂肪族、複素環式系列の ポリアルコールでエステル化され、スパーサー鎖によって架橋を生じたヒアルロ ン酸の架橋化合物が EP 0265116 B1 に開示される。また、ヒアルロン酸またはヒア ルロン酸の部分的または全体的エステルとの、コハク酸ヘミエステルが W0 95/25751 に開示される。また、ヒアルロン酸の水溶液を酸性に調整し、該水溶液 を凍結し、次いで解凍することを少なくとも 1 回行うことによって生成する自己 架橋ヒアルロン酸ゲルが W099/10385 に開示される。また、凍結を行わずとも 5 質 量%以上の濃度になるようにヒアルロン酸と酸性溶液を混合・該共存状態を保持 することで生成する自己架橋ヒアルロン酸が W001/57093 に開示される。ヒアルロ ン酸をエステル誘導体化することにより、ヒアルロン酸の水溶液と比較して、生 体内での滞留性が向上することが開示されている。

ヒアルロン酸のエステル誘導体を関節治療剤に使用する場合、粘弾性的な性質 の制御が目的なら、エステル架橋したヒアルロン酸のエステル誘導体が好ましい。 多価アルコールとヒアルロン酸のカルボキシル基のエステル、多価カルボン酸と ヒアルロン酸の水酸基とのエステル、ヒアルロン酸のカルボキシル基と水酸基間 がエステル結合した自己架橋ヒアルロン酸が好ましい。エステル結合が関節腔内 で加水分解することにより、天然のヒアルロン酸の容器 (reservoirs) とするこ

とを目的とする場合でも、低エステル化度で生体内の滞留性を大きく変化することが出来るエステル架橋したヒアルロン酸が好ましい。

自己架橋ヒアルロン酸の安全性は、自己架橋ヒアルロン酸の分解により放出される天然のヒアルロン酸が生理学的代謝経路により代謝されるので、別の架橋反応により製造されたエステル架橋ヒアルロン酸より良好である可能性がある。

ヒアルロン酸のエステル誘導体を関節治療剤に使用するとき、天然のヒアルロン酸の容器 (reservoirs) とすることを目的とする場合、放出されるヒアルロン酸自体の分子量が大きい方が好ましい。ヒアルロン酸の関節腔内からの代謝 (移動) が、ヒアルロン酸自体の分子量に大きく左右されることが知られている (Ciba Foundation Symposium 143, The Biology of Hyaluronan, John Wiley & Sons, 1989, p265)。

放出されるヒアルロン酸の分子量が約 30 万以下の場合、放出されたヒアルロン酸は速やかに関節腔内から代謝 (移動) するため、関節治療の効果は大きく減じる可能性がある。

ヒアルロン酸のエステル誘導体を関節治療剤に使用する場合、注射針を通して関節腔内に注入するため、ヒアルロン酸のエステル誘導体は生理的に受容可能な媒質に分散した懸濁液にする必要がある。懸濁液は、ヒアルロン酸のエステル誘導体をその製造工程、精製工程のいずれかの段階で、ミキサーやホモジナイザーのような破砕機を用いて破砕することにより調整できる。ヒアルロン酸のエステル誘導体の分散粒子径は、関節治療剤の物理化学的な性質や効果を制御するため任意に調整することができる。ヒアルロン酸のエステル誘導体を、生理的に受容可能な媒質に分散した後、ホモジナイザーで処理すれば、0.05 mm ~ 2.0 mm の分散粒子径に容易に調整できる。

エステル架橋ヒアルロン酸は、生理的に受容可能な媒質中で膨潤してゲルになる。ゲルの平衡膨潤倍率は、エステル架橋ヒアルロン酸の架橋度によって任意に調整することができる。例えば、平衡膨潤倍率が 100 倍の場合、生理的に受容可能な媒質中のヒアルロン酸濃度は 1.0 質量% になる。平衡膨潤倍率が 10 倍

の場合、生理的に受容可能な媒質中のヒアルロン酸濃度は10質量%になる。エステル架橋ヒアルロン酸を関節治療剤に使用するとき、天然のヒアルロン酸の容器 (reservoirs) とすることを目的とする場合、生理的に受容可能な媒質中のヒアルロン酸濃度が高い方が、関節腔内へ注入する容量を一定にした場合、関節腔内に注入するヒアルロン酸量を大きくできるため、大きな治療効果が期待できる。

市販されている膝関節治療剤、例えばアルツやスベニールなどのヒアルロン酸水溶液のヒアルロン酸濃度は1.0質量%である。生理的に受容可能な媒質中に分散されたエステル架橋ヒアルロン酸の濃度が1質量%より小さい場合、市販品以上の大きな治療効果は望めない。またヒアルロン酸分子自体が水に対して大きな親和性を有するため、生理的に受容可能な媒質中にエステル架橋ヒアルロン酸を分散した場合、そのヒアルロン酸濃度を20質量%よりも大きくすることは、分散液の流動性を著しく損なうため実用的ではない。

本発明において、pH 4.5～6.5に緩衝されたヒアルロン酸エステル誘導体を含む水溶液の(A)液と、(A)液と混合したときのpHを6.8～7.8の範囲内にする緩衝能を有する水溶液の(B)液は、最終的に(A)液と(B)液を混合したとき、生理的に受容な水性媒質である。生理的に受容とは、関節治療剤が関節腔内に注入されたとき、水性媒質自身が好ましくない作用もしくは副作用、例えば、組織の膨潤または収縮、炎症等の原因とならないことを意味する。生理的に受容な水性媒質は、通常アルカリもしくはアルカリ土類金属の塩化物、硫酸塩、リン酸塩または重炭酸塩のような無機塩類、例えば塩化ナトリウム、硫酸ナトリウム、塩化マグネシウム、及び対応するカリウム、カルシウム塩、乳酸ナトリウム、酢酸ナトリウムのような有機酸の塩、またはグルコース、マンノース、多価アルコールのような中性有機物質、例えばグリセリン、マンニトール等から選択される1つ以上の低分子量物質の水溶液である。低分子量成分の種類と量は、最終的に(A)液と(B)液を混合したとき、生理的に受容な浸透圧、pH、イオン含量になることを考慮して選択されるべきである。

pH 4.5～6.5に緩衝されたヒアルロン酸エステル誘導体を含む水溶液の

(A) 液の緩衝成分は、指定の pH に緩衝できる生理的に受容な成分から任意に選択できる。例えば、酢酸－酢酸ナトリウム、乳酸－乳酸ナトリウム、クエン酸－クエン酸ナトリウムのような有機酸塩が好適である。ヒアルロン酸自体もカルボキシル基を有する高分子電解質であり、ヒアルロン酸自体が有する緩衝性も有効に利用できる。

(A) 液と混合したときの pH を 6.8 ～ 7.8 の範囲内にする緩衝能を有する水溶液の (B) 液の緩衝成分は、医薬品添加物として使用が認められている物質から、最終的に (A) 液と (B) 液を混合したとき、生理的に受容な浸透圧、pH、イオン含量になることを考慮して、任意に選択することができる。例えば、(A) 液の緩衝成分が酢酸－酢酸ナトリウムの場合、(B) 液の緩衝成分として水酸化ナトリウムを選択すると、最終的に (A) 液と (B) 液を混合したとき、酢酸ナトリウムが生成する。

(A) 液と混合したときの pH を 6.8 ～ 7.8 の範囲内にする緩衝能を有する水溶液の (B) 液がヒアルロン酸を溶解した水溶液である場合、ヒアルロン酸自体が不安定な物質であることも考慮する必要がある。ヒアルロン酸はナトリウム塩の形で製剤化して適用されているが、ヒアルロン酸ナトリウムさえも水溶液の状態においては安定性に欠けている。また、ヒアルロン酸は分子量が大きくなるほど安定性が悪くなるという性質を有する。ヒアルロン酸ナトリウムの溶液は、pH によってその安定性が左右され、中性付近においては比較的安定なものである。そのため、この場合、(B) 液自体の pH も 8.0 以下にし、緩衝成分の濃度によって緩衝能を調整することが望ましい。pH を 8.0 以下に調整する緩衝成分としては、例えば、リン酸緩衝成分、ホウ酸緩衝成分、炭酸緩衝成分、有機物系緩衝成分を使用することができる。溶解するヒアルロン酸の濃度は、関節治療剤としての有効性から 0.5 ～ 2.0 質量% の範囲にすることが望ましい。

(A) 液と、ヒアルロン酸を溶解した場合は (B) 液にも、ヒアルロン酸自体の安定性を向上させることができる安定剤を添加することができる。ヒアルロン酸自体の安定性を向上させる安定剤は、例えば、特開平 8-104642 号、特

開平 10-212303 号、特開平 11-302197 号に開示されている。

安定剤自体が pH の制限を受けないことから、例えば、ヨウ素含有の還元剤やイオウ含有の還元剤は好適である。また、ヒアルロン酸自体の安定性が、鉄などの重金属イオンに大きく左右される場合があることから、リン酸などの金属の不活性剤を添加することも有効である。

次に本発明の分離型医療材料についての実際の保存形態について述べる。

(A) 液と (B) 液を分離して保存する実際の形態において、(A) 液はヒアルロン酸のエステル誘導体を破碎後に特定の水性媒質に分散させた懸濁液として容器に充填される。(B) 液は、(A) 液と保存中に混合しないように、別の容器又は同一容器内の別の区画に充填される。一般的に、医薬品・医療材料として製品を提供する場合には、シリンジに充填して供する。例えば、二液分離型のプレフィルシリンジなどが目的に合致しており、このような保存容器によって (A) 液と (B) 液を別々に封入するのが好ましい。ここで、通液用のシリンジの突起部分の位置、ゴム栓位置などは、(A) 液と (B) 液の封入量や容積比に応じて最適の位置に調整されるものである。(A) 液と (B) 液の混合性を向上させる目的で、スタティックミキサー等を装着した容器を使用することができる。

スタティックミキサーは二液分離型のプレフィルシリンジのシリンジ先端にも、(A) 液と (B) 液を別々のシリンジに充填し、2つのシリンジの先端の混合部分にも装着することができる。

本発明の関節治療用に用いる医療材料には、医薬品又は医薬的に受容し得る潤滑剤を含有することができる。医薬品としては、麻酔剤、抗生物質、ステロイド性及び非ステロイド性の抗炎症剤、ソマトスタチン等のホルモントタイプの抗炎症剤、上皮親和性のビタミン、IL-1 及び IL-6 等のサイトカイン、サイトカイン受容体、FGF 等の増殖因子、抗リウマチ剤、抗アレルギー剤、免疫抑制剤等の適当な医薬的に活性な薬剤を添加することができる。

潤滑剤としては、リン脂質が好適である。本発明に用いられるリン脂質は、動物組織から抽出したものでも、また人工的に合成して製造したものでもその起源

を問うことなく使用できる。リン脂質は、好ましくはフォスファチジルコリン、フォスファチジルエタノールアミン、フォスファチジルセリン、フォスファチジルグリセロール、フォスファチジリンイノシトール、スフィンゴミエリン及びそれらの誘導体を含む。特に好ましくは、 α -ジパルミトイルフォスファチジルコリン (α -DPPC) である。この α -DPPC は L 体、D 体、あるいはラセミ (DL) 体混合物でもよい。

本発明に用いられるリン脂質の濃度は、 $1 \sim 200 \text{ mg/ml}$ が好ましい。リン脂質の濃度が 1 mg/ml 未満では、関節用医薬品としては効果が低く、 200 mg/ml を越えるとリン脂質の凝集が大きくなり保存の面で難があり、取り扱いが難しくなるため好ましくない。リン脂質は、両親媒性物質なのでヒアルロン酸溶液中での安定性などの目的のためリポソーム化しても良いが、特にリポソーム化せず懸濁させるだけでもよい。

本発明の関節治療用に用いる医療材料に添加する医薬品又は医薬的に受容し得る潤滑剤は、医薬品や潤滑剤の物理化学的な性質や添加する目的に応じて、(A) 液または (B) 液のいずれかに添加すること、また両液に添加することは任意である。また同様に、(A) 液中のヒアルロン酸のエステル誘導体の分散粒子内に添加するか、分散媒質中に添加するか、またその両者に添加するかも任意である。例えば、添加する医薬品の関節腔内での濃度を一定に保つように、すなわち DDS 効果を持つように製剤設計する場合は、ヒアルロン酸のエステル誘導体の分散粒子内に所望の医薬品や潤滑剤を添加することが望ましい。

本発明の分離型医療材料として提供される形態は、シリンジに充填された関節注入型医療材料が挙げられる。

実施例

以下、本発明を実施例によりさらに詳しく説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

実施例 1

凍結・解凍法によるヒアルロン酸ゲルの製造例

ヒアルロン酸ナトリウム（電気化学工業社製：分子量 2×10^6 ダルトン）を蒸留水に溶解し、1 質量%のヒアルロン酸の水溶液を調製した。この水溶液の pH を、 1 mol/l 塩酸（和光純薬）で pH 1.5 に調整する。ヒアルロン酸の酸性水溶液 15 ml を 30 ml のガラスビンに入れ、 -20°C に設定した冷凍庫に入れた。そして65時間放置した後、 25°C で解凍した。その結果、スポンジ状のヒアルロン酸ゲルが得られた。

このゲルを、 100 mmol/l のリン酸緩衝液（pH 6.8）に何度か浸漬させ、ゲルを完全に中和する。次に得られたスポンジ状のヒアルロン酸ゲルをミキサーにより破碎し、ゲル破碎懸濁液を得た。これを、 $3,000 \text{ rpm}$ 、5分の条件で遠心分離し、ゲル分を分離して、これに新しい緩衝液を加える操作を5回以上繰り返し、ゲル溶媒を 5 mmol/l リン酸緩衝生理食塩水に置換した。

以上の方法により、酸性凍結・解凍法で製造されたヒアルロン酸ゲル懸濁液が得られた。

酸混合法によるヒアルロン酸ゲルの製造例

ヒアルロン酸ナトリウム（電気化学工業社製、分子量 2×10^6 ダルトン）の粉末を 5 g 量り取り、これに氷冷しておいた 15 ml の 1 N 硝酸（和光純薬）を添加した。両者をビーカー内で十分に混合した後、ビニール袋に入れた状態で 4°C の冷蔵庫に入れ、65時間放置した。その結果、スポンジ状のヒアルロン酸ゲルが得られた。これを、 100 mmol/l のリン酸緩衝液（pH 6.8）に何度か浸漬させ、ゲルを完全に中和した。次に得られたスポンジ状のヒアルロン酸ゲルをミキサーにより破碎し、ゲル破碎懸濁液を得た。これを、 $3,000 \text{ rpm}$ 、5分の条件で遠心分離し、ゲル分を分離して、これに新しい緩衝液を加える操作を5回以上繰り返し、ゲル溶媒を 5 mmol/l リン酸緩衝生理食塩水に置換した。以上の方法により、酸混合法で製造されたヒアルロン酸ゲル懸濁液が得られた。

以上の方法で製造したヒアルロン酸ゲルの pH 安定性を、以下の加速試験で評価した。評価には、pH 4、pH 5、pH 6、pH 7 の酢酸緩衝生理食塩水及び

リン酸緩衝生理食塩水に懸濁された1質量%のヒアルロン酸濃度になるように調節したゲル懸濁液を用いた。

ゲル懸濁液10mlを15mlのプラスチックチューブに入れ、これを60℃の温浴上で放置し、2時間おきにサンプリングを行った。サンプリングした液は、まず12,000rpm、5分の遠心でゲル分を除き、その後0.22μmのフィルターでろ過して完全にゲルを除去した。これについてGPC分析と比色分析を行い、ヒアルロン酸濃度を求めた。この上清中のヒアルロン酸濃度は、ゲルが溶解した濃度であるために、初期濃度との比から残存するゲルの割合と溶解したゲルの割合が求められる（両者の和は100%に相当する）。以上の方法により、各サンプリング時間における残存するゲルの割合を調べた。結果を表1に示す。

表 1

時間	ゲル残存率 (%)			
	pH4	pH5	pH6	pH7
0	100	100	100	100
2	99	99	99	98
4	98	99	98	97
6	97	99	96	95
8	95	99	96	93
10	95	98	94	89
12	93	97	93	89
14	93	97	92	89
16	90	97	90	87
25	88	95	84	75

表 1 に示すように、溶解後 25 時間では pH 7 に調整したゲル懸濁液のゲル残存率が 75 % であるのに対して、pH 6 に調整したゲル懸濁液では 84 % が、そして pH 4 に調整したゲル懸濁液では 88 % が残存していた。更に、pH 5 では 95 % ものゲルが残存しており、有意に pH 5 付近の低 pH 側でのゲルの保存安定性があることがわかった。

実施例 2

ヒアルロン酸ナトリウム（電気化学工業社製：分子量 2×10^6 ダルトン）を蒸留水に溶解し、1 質量 % のヒアルロン酸の水溶液を調製した。この水溶液の pH を、 1 mol/l 塩酸（和光純薬）で pH 1.5 に調整する。ヒアルロン酸の酸性水溶液 100 ml を 200 ml のガラスビンに入れ、 -20°C に設定した冷凍庫に入れた。そして 14 日間放置した後、 25°C で解凍した。その結果、スポンジ状のヒアルロン酸ゲルが得られた。

これを、 100 mmol/l のリン酸緩衝液（pH 6.8）に何度か浸漬させ、ゲルを完全に中和する。次に得られたスポンジ状のヒアルロン酸ゲルをミキサーにより破碎し、ゲル破碎懸濁液を得た。これを、 $3,000 \text{ rpm}$ 、5 分の条件で遠心分離しゲル分を分離した。ゲル分に 1 リットルの蒸留水を加え、攪拌下で洗浄した。ゲル分の遠心分離と洗浄を 5 回繰り返して、中和剤のリン酸緩衝成分を完全に除去した。生理的食塩水に 5 質量 % のヒアルロン酸濃度とし、その pH を塩酸を加えて 5.0 に調整し、(A) 液とした。 0.01 N の水酸化ナトリウム水溶液を調製し、(B) 液とした。

上記 pH 5.0 に調整した (A) 液 10 ml に、上記 (B) 液 1.6 ml を加えて良く混合した。混合された水溶液の pH は 7.4 だった。

実施例 3

ヒアルロン酸ナトリウム（電気化学工業社製：分子量 2×10^6 ダルトン）を 20 mM のリン酸緩衝液で pH を 8.0 に緩衝した生理的食塩水に溶解し、(B) 液とした。実施例 2 で調製した (A) 液 2.0 ml に、上記で調製した (B) 液 8.0 ml を加えて良く混合した。混合された水溶液の pH は 7.4 だった。

実施例 4

ヒアルロン酸ナトリウム（電気化学工業社製：分子量 2×10^6 ダルトン）を 20 mM のホウ酸緩衝液で pH を 8.0 に緩衝した生理的食塩水に溶解し、(B) 液とした。実施例 2 で調製した (A) 液 2.0 ml に、上記で調製した (B) 液 8.0 ml を加えて良く混合した。混合された水溶液の pH は 7.4 だった。

実施例 5

凍結・解凍法によるヒアルロン酸ゲルを含む分離型医療材料の製造例

ヒアルロン酸ナトリウム（電気化学工業社製、分子量 2×10^6 ダルトン）を蒸留水に溶解し、1 質量% のヒアルロン酸の水溶液を調製した。この水溶液の pH を、1 mmol/l 塩酸（和光純薬）で pH 1.5 に調整した。ヒアルロン酸の酸性水溶液 15 ml を 30 ml のガラスビンに入れ、 -20°C に設定した冷凍庫に入れた。

そして 65 時間放置した後、 25°C で解凍し、スポンジ状のヒアルロン酸ゲルが得られた。これを、100 mmol/l のリン酸緩衝液（pH 6.8）に何度か浸漬させ、ゲルを完全に中和した。

次に、得られたスポンジ状のヒアルロン酸ゲルをカップミキサー（12,000 rpm、2 分）により破碎し、ゲル破碎懸濁液を得た。これを、3,000 rpm、5 分の条件で遠心分離し、ゲル分を分離した。そして、これに新しい緩衝液を加える操作を 5 回以上繰り返し、ゲル溶媒を pH 5 の 5 mmol/l 酢酸緩衝生理食塩水に置換した。

2 質量% 濃度になるように酢酸緩衝生理食塩水に懸濁したヒアルロン酸ゲル懸濁液（pH 5.0）の (A) 液と、1 質量% 濃度になるようにリン酸緩衝生理食塩水（pH 7.5）に溶解したヒアルロン酸（電気化学工業社製）溶液の (B) 液とを、(A) : (B) = 2 : 8 になるようにトップ社のプレフィルシリンジ（G タイプ）に別々に充填した。すなわち、図 1 に示すように (A) 液のヒアルロン酸ゲル懸濁液を注射口側のコンパートメント (A) に 0.6 ml 充填し、(B) 液のヒアルロン酸溶液をプランジャー側のコンパートメント (B) に 2.4 ml

充填した。

実施例 6

酸混合法によるヒアルロン酸ゲルを含む分離型医療材料の製造例

ヒアルロン酸ナトリウム（電気化学工業社製、分子量 2×10^6 ダルトン）の粉末を 5 g 量り取り、これに氷冷しておいた 15 ml の 1 mol/l 硝酸（和光純薬）を添加した。両者をビーカー内で十分に混合した後、ビニール袋に入れた状態で 4℃ の冷蔵庫に入れ、65 時間放置した。その結果、スポンジ状のヒアルロン酸ゲルが得られた。これを、100 mmol/l のリン酸緩衝液（pH 6.8）に何度か浸漬させ、ゲルを完全に中和した。

次に、得られたスポンジ状のヒアルロン酸ゲルをカップミキサー（12,000 rpm、2 分）により破碎し、ゲル破碎懸濁液を得た。これを、3,000 rpm、5 分の条件で遠心分離し、ゲル分を分離した。そして、これに新しい緩衝液を加える操作を 5 回以上繰り返し、ゲル溶媒を pH 5 の 5 mmol/l 酢酸緩衝生理食塩水に置換した。

2 質量％濃度になるように酢酸緩衝生理食塩水に懸濁したヒアルロン酸ゲル懸濁液（pH 5.0）の（A）液と、1 質量％濃度になるようにリン酸緩衝生理食塩水（pH 7.5）に溶解したヒアルロン酸（電気化学工業社製）溶液の（B）液とを、（A）：（B）＝2：8 になるようにトップ社のプレフィルシリンジ（G タイプ）に別々に充填した。すなわち、図 1 に示すように（A）液のヒアルロン酸ゲル懸濁液を注射口側のコンパートメント（A）に 0.6 ml 充填し、（B）液のヒアルロン酸溶液をプランジャー側のコンパートメント（B）に 2.4 ml 充填した。

比較例 1

非分離型のヒアルロン酸とヒアルロン酸ゲルの混合医療材料の調製

2 質量％濃度になるように酢酸緩衝生理食塩水に懸濁したヒアルロン酸ゲル懸濁液（pH 5.0）の（A）液と、1 質量％濃度になるようにリン酸緩衝生理食塩水（pH 7.5）に溶解したヒアルロン酸（電気化学工業社製）溶液の（B）

液とを、(A) : (B) = 2 : 8 になるように混合後にテルモ社のシリンジ (S-02S2138) に注入した。

実施例 7

ヒアルロン酸製剤中のヒアルロン酸ゲル安定性

実施例 2 と比較例 1 で調製した複数のシリンジを 60℃ の恒温槽に保存した。これを各時間に取り出し、サンプリングを行った。サンプリングした液は、まず 12,000 rpm、5 分の遠心でゲル分を除き、その後 0.22 μm フィルターでろ過して完全にゲルを除去した。これについて GPC 分析と比色分析を行い、ヒアルロン酸濃度を求めた。この上清中のヒアルロン酸濃度は、ゲルが溶解した濃度分だけ増加しているために、初期濃度との比から残存するゲルの割合と溶解したゲルの割合が求められる (両者の和は 100% に相当する)。以上の方法により、各サンプリング時間における残存するゲルの割合を調べた。結果を表 2 に示す。

表 2

	ゲル残存率 (%)				
	0 時間	10 時間	15 時間	20 時間	25 時間
実施例 1	100	99	98	97	94
比較例 1	100	90	85	70	64

表 2 に示すとおり、60℃ に保存した時間が 25 時間後では、均一に混合された比較例 1 では、ゲルが開始時の 64% しか残存していなかったのに対して、実施例 1 の分離させた状態でのゲル残存率は開始時の 94% と有意に高かった。これより、分離して保存することでゲルの安定性を高めることがわかった。

実施例 8

ヒアルロン酸製剤の生体内での貯留性

膝関節製剤としての有効性を評価するために、実施例 5 で作成したヒアルロン

酸ゲルとヒアルロン酸溶液の分離型医療材料のウサギ膝関節内貯留性試験を行った。試験は次の手順で行った。3ヶ月齢のウサギ（K b s : N Z W雄）の左膝に0.25mlのヒアルロン酸ゲルとヒアルロン酸溶液の混合液（ヒアルロン酸ゲル懸濁液：ヒアルロン酸溶液＝2：8）を投与した。投与1日及び3日後に、動物をペントバルビタールナトリウムの耳介静脈内投与による麻酔後、放血致死させた。その後投与した方の脚を切断し膝関節を背面より切開して、腔内を生理食塩水で洗いだし、膝関節腔内貯留液を回収した。また、投与しない方の脚についても同様の回収を行った。得られた関節腔内貯留液はpHをアルカリ側に調整して残存するヒアルロン酸ゲルを完全に分解させた後、GPC分析により全ヒアルロン酸量を定量した。そして、投与を行っていない方の膝から回収した貯留液のヒアルロン酸量でバックグラウンド補正をして、投与後1日および3日後のヒアルロン酸の回収率を得た。

その結果、投与してから1日経過後のヒアルロン酸の回収率は、80%であり、投与してから3日経過後のヒアルロン酸の回収率は、50%であった。

従って、投与してから1日経過後と3日経過後で、それぞれ関節腔に投与したヒアルロン酸が残存していることがわかり、関節製剤としての有用性が示された。

産業上の利用可能性

本発明によれば、弱酸性のヒアルロン酸のエステル誘導体の分散水溶液とその中和剤水溶液、中和剤水溶液中にヒアルロン酸が溶解している場合も含めて、両者が異なったpH条件になるように、分離された状態で保持しておくことで、保存安定性に優れた状態とすることができる。

分離された状態で保持しておき、治療する投与時に混合することで、最終的には生理的な中性pH条件で投与できるような製剤を提供することができる。

本発明により、ヒアルロン酸のエステル誘導体の保存安定性と関節治療剤の注射時の刺激性や疼痛の回避を両立することができ、ヒアルロン酸のエステル誘導体を関節治療剤として提供することができる。

請求の範囲

1. pH 4.5 ～ 6.5 に緩衝されたヒアルロン酸エステル誘導体を含む水溶液の (A) 液と、該 (A) 液と混合したときの pH を 6.8 ～ 7.8 の範囲内にする緩衝能を有する水溶液の (B) 液とからなり、(A) 液と (B) 液とは投与時には混合して投与されるが、投与前は分離された状態で保持されていることを特徴とする分離型医療材料。
2. (A) 液のヒアルロン酸エステル誘導体が、自己架橋ヒアルロン酸であることを特徴とする請求項 1 に記載の分離型医療材料。
3. (A) 液のヒアルロン酸エステル誘導体を含む水溶液のヒアルロン酸エステル誘導体の濃度が 1 ～ 20 質量% の範囲であることを特徴とする請求項 1 又は 2 に記載の分離型医療材料。
4. (A) 液と混合したときの pH を 6.8 ～ 7.8 の範囲内にする緩衝能を有する水溶液の (B) 液が、ヒアルロン酸を溶解した水溶液であることを特徴とする請求項 1、2、又は 3 に記載の分離型医療材料。
5. 更に、医薬品又は医薬的に受容し得る潤滑剤を含有することを特徴とする請求項 1 ～ 4 のいずれかに記載の分離型医療材料。
6. pH 4.5 ～ 6.5 に緩衝されたヒアルロン酸エステル誘導体を含む水溶液の (A) 液に、医薬品又は医薬的に受容し得る潤滑剤が溶解又は分散していることを特徴とする請求項 5 に記載の分離型医療材料。
7. (A) 液のヒアルロン酸エステル誘導体中に、医薬品又は医薬的に受容し得る

る潤滑剤が溶解又は分散していることを特徴とする請求項 5 又は 6 に記載の分離型医療材料。

8. (A) 液と混合したときの pH を 6.8 ～ 7.8 の範囲内にする緩衝能を有する水溶液の (B) 液に、医薬品又は医薬的に受容し得る潤滑剤が溶解又は分散していることを特徴とする請求項 5 ～ 7 のいずれかに記載の分離型医療材料。

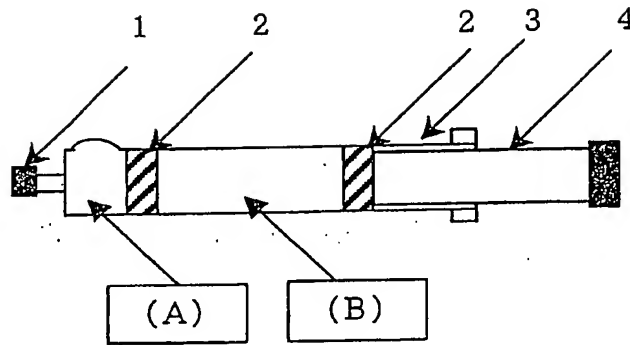
9. 医薬的に受容し得る潤滑剤がリン脂質であることを特徴とする請求項 5 ～ 8 のいずれかに記載の分離型医療材料。

10. シリンジに (A) 液と (B) 液とが分離した状態で充填された関節注入型医療材料であることを特徴とする請求項 1 ～ 9 のいずれかに記載の分離型医療材料。

11. 請求項 1 ～ 10 のいずれかの分離型医療材料を構成する (A) 液と (B) 液とを、投与直前に混合した混合液を患者の関節に注入して投与することを特徴とする関節疾患用医療材料の投与方法。

1/1

図 1



A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl.⁷ A61K31/728, 45/08, 9/08, A61P19/02

B. 調査を行った分野
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl.⁷ A61K31/728, 45/08, 9/08, A61P19/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
CA (STN), REGISTRY (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP 2001-129073 A (オリンパス光学工業株式会社) 2001. 05. 15 (ファミリーなし)	1-10
A	WO 99/15150 A (BIOMEDIAL, INC.) 19 99. 04. 01 & US 6391336 A & CA 2303 884 A & AU 9894925 A & EP 1017364 A1 & JP 2001-517613 A	1-10

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に関する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

31. 10. 02

国際調査報告の発送日

12.11.02

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号 100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)
村上崎見高

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

4C

8827

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 11 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、請求の範囲11に係る発明は、「人の身体の手術又は治療による処置及び診断方法」に該当する。
2. ☐ 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。